

PCT
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



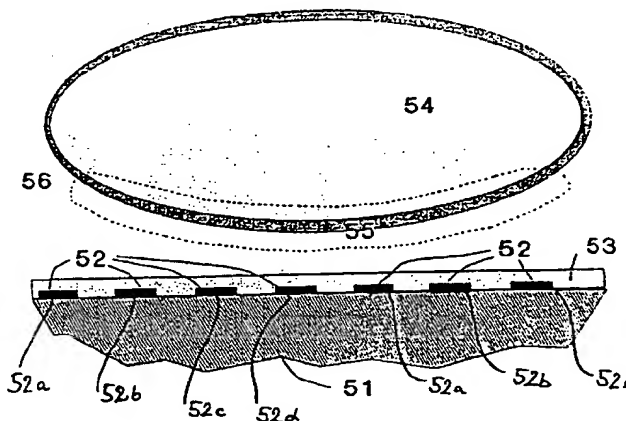
(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : B03C 5/00, 5/02, G01N 33/483, 33/487	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 95/17258 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 29. Juni 1995 (29.06.95)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE94/01530 (22) Internationales Anmeldedatum: 23. December 1994 (23.12.94) (30) Prioritätsdaten: P 43 44 351.6 23. December 1993 (23.12.93) DE P 44 00 955.0 14. Januar 1994 (14.01.94) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Leonrodstrasse 54, D-80636 München (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FUHR, Günter [DE/DE]; Berliner Strasse 28A, D-13127 Berlin (DE). VOIGT, An- dreas [DE/DE]; Ahrenshooper Strasse 67, D-13051 Berlin (DE). HAGEDORN, Rolf [DE/DE]; Wartiner Strasse 16, D- 13027 Berlin (DE). LISEC, Thomas [DE/DE]; Sewanstrasse 233, D-10319 Berlin (DE). MÜLLER, Torsten [DE/DE]; Harriegel Strasse 100, D-12439 Berlin (DE). WAGNER, Bernd [DE/DE]; Dievenowstrasse 2, D-14199 Berlin (DE). (74) Anwalt: LEONHARD, Reimund; Leonhard, Olgemöller, Fricke, Josephspitalstrasse 7, D-80331 München (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	

(54) Title: ULTRA-MINIATURISED SURFACE STRUCTURES WITH CONTROLLABLE ADHESION

(54) Bezeichnung: ADHÄSIONSSTEUERBARE ULTRAMINIATURISIERTE OBERFLÄCHENSTRUKTUR

(57) Abstract

In order to prevent or to selectively increase particle adsorption or adhesion on flexible or rigid materials, extremely miniaturised (in the sub-micrometric range) planar electrode strips (22; 42, 44; 52) are applied on a surface (21; 41; 51) to which high-frequency pulse trains may be applied to generate progressive or stationary electric surface waves. The electrodes in themselves are combined with dielectric insulating materials (23; 43, 45; 53) with controlled biocompatibility. The type of electric drive, together with the properties of the surface layers that cover the electrodes, determines the adhesion properties of the surface to a large extent regardless of the used base material. Particle movement is gently influenced, so that for the first time it becomes possible to influence particles in highly physiological nutritive solutions.



(57) Zusammenfassung

Zur Vermeidung oder selektiven Erhöhung von Teilchenadsorptionen bzw. -adhäsionen auf flexiblen oder starren Materialien werden extrem miniaturisierte (im Submikrometerbereich) planare Elektrodenstreifen (22; 42, 44; 52) auf eine Oberfläche (21; 41; 51) aufgebracht, die mit hochfrequenten Impulsfolgen so beaufschlagbar sind, daß wandernde oder stehende elektrische Oberflächenwellen entstehen, wobei die Elektroden selbst mittels dielektrischer, oder in ihrer Biokompatibilität geprüfter Isolier-Materialien (23; 43, 45; 53) kombiniert werden und damit partiell oder vollständig bedeckt sind. Die Art der elektrischen Ansteuerung bestimmt in Kombination mit den Eigenschaften der Basismaterial. Die Teilchen werden schonend in ihrer Bewegung beeinflusst. Erstmals wird es möglich, Teilchen in hochphysiologischen Nährlösungen zu beeinflussen.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Adhäsionssteuerbare ultraminiaturisierte Oberflächenstruktur

Die Erfindung betrifft eine leitfähige Oberflächenstruktur, um suspendierte mikroskopische Partikel und Zellen zu beeinflussen.
5 Sie betrifft auch die Verwendung dieser Struktur zur Steuerung der Adhäsionseigenschaften der Partikel und Zellen.

In der Medizintechnik, der Biokompatibilitätsforschung, insbesondere bei der Herstellung transplantierbarer Materialien, aber auch in der biologisch-pharmakologischen Forschung wird
10 seit langem nach Oberflächen gesucht, die einerseits abstoßend auf in physiologischen und technischen Lösungen befindliche Partikeln und Zellen wirken, andererseits in bestimmten Fällen die Adhäsion fördern (BOGRAND, P. (ed.), Physicl Basis of Cell-
15 Cell-Adhesion, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1988. CURTIS, A.S.G., PITTS, J.D. (eds.), Cell Adhesion and Motility, Cambridge University Press, Cambridge, 1980. GRINELL, F., Int. Rev. Cytol, 53:65-144, 1978. LEE, L.H., Recent Advances in Adhesion, Gordon & Breach, London, 1973. OTTEWILL, R.H.,
20 ROCHESTER, C.H., SMITH, A.L. (eds.), Adsorption from Solution, Academic Press, London. PERELSON, A.S., DeLISI, Ch., WIEGEL, F.W., Cell Surface Dynamics, Concepts and Models, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, 1984). In der Regel wird diese "Oberflächenmodifizierung" über Hydrophilisierung oder
25 Hydrophobisierung, über die Ankopplung geladener molekularer Gruppen oder durch lokale Ankopplung hochspezifischer Bindungsstellen (z.B. Antikörper) erreicht. Nachteilig an diesen Oberflächenmodifizierungen ist die geringe Reichweite in die Partikelsuspension (in der Regel wenige Å), die sehr
30 unterschiedliche Langzeitstabilität, sowie die nicht vorhandene Steuerbarkeit der Effekte.

Daß elektrische Felder über Elektroden in eine Partikel- oder Zellsuspension ausgekoppelt werden können und über Polarisaton
35 der Teilchen Moleküle und Zellen zu den Elektroden hin- oder wegdrücken können, wurde ausführlich von POHL 1978 (POHL, H.P., Dielectrophoresis, Cambridge Press, Cambridge 1978) untersucht und in Patenten, wie US 4,390,403, fixiert.

Diese als Dielektrophorese bezeichneten Kräfte können sowohl **anziehend** (positive Dielektrophorese) als auch **abstoßend** (negative Dielektrophorese) wirken. Das Phänomen wird sowohl zur Sammlung von Schmutzpartikeln in makroskopischen Filtern als auch zur Sammlung und Separation von Zellen und Mikropartikeln in Mikrostrukturen genutzt, allerdings bisher aus folgenden Gründen nur begrenzt nutzbar:

- (i) Elektroden wurden im makroskopischen Bereich verwendet und, bis zu einigen Mikrometern miniaturisiert, auch auf planaren Oberflächen erzeugt. Die in die Flüssigkeit entkoppelten elektrischen Hochfrequenzfelder durchdringen dann mit nahezu gleicher Feldstärke die gesamte Zelle, woraus eine **hohe Belastung** der Objekte (Zellen und Partikel) resultiert und sehr hohe Anregungsspannungen erforderlich sind (einige V bis zu einigen 100V).
- (ii) Die Elektroden sind immer noch so groß, daß sich Zellen auf ihnen **ablageren können**, obwohl das Feld angeschaltet ist, da sie auf der breiteren Elektrode keine Nachbarelektroden mehr spüren, wodurch der angestrebte Effekt zunichte gemacht wird. Dieses Problem entsteht z.B. in der WO 91/11262 (P & B Sciences Limited), wo zwar ein Elektrodenarray benutzt wird, das kammerförmig (vgl. die dortige Figur 1B) sein kann, nicht aber dessen Größe und Abmessung an die zu beeinflussenden Partikel anpaßt. Diese WO befaßt sich vielmehr ausschweifend mit den Größen und Formen von "non-uniform-Magnetfeldern" und deren Einfluß auf chemische Reaktionen **zwischen** den Zellen.
- (iii) Mit den Elektroden in Kontakt gekommene oder direkt von ihnen angezogene Zellen oder Partikel **verändern sich** auf Grund der Metall-Zelloberflächenreaktion irreversibel.

Hochfrequente Wanderwellen, erzeugt über elektrische Signale, wurden von MELCHER zum Pumpen von Ölen genutzt (MELCHER, J.R., The physics of fluids, 9:1548-1555, 1966). Ende der 80er, Anfang der 90er Jahre konnte dieses Prinzip auch in Mikrokanälen
5 mittels halbleitertechnologisch gefertigter Elektrodenstrukturen umgesetzt werden. Das Prinzip beruhte auf der Stabilisierung eines Temperaturgradienten und der Erzeugung phasenverschobener Raumladungen. Auch hier lag die Elektrodenbreite bei einigen 10µm (FUHR, G. et al., MEMS 92, Proceedings, 1992).

10 Daß auch Partikel und Zellen mittels wandernder elektrischer Felder selektiv bewegt werden können, wurde von MASUDA (MASUDA, S., IEEE Transaction on Industry Applications, 24, 217-222, 1988) gezeigt und 1991 auf hochfrequente Wanderwellen
15 ausgedehnt (FUHR, G. et al., MEMS 91, Proceedings, 259-264, 1991). Ziel dieser planaren Anordnung war die Bewegung einzelner Zellen in Mikrokanalsystemen mit dem Ziel der Zellseparation, wie sie in WO 91/3850 (Fraunhofer-Gesellschaft) näher erläutert ist.

20 Gegenüber diesem Stand der Technik liegt der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, eine Oberfläche in ihrem Adhäsionsverhalten insbesondere für suspendierte Zellen und Makromoleküle elektrisch steuerbar zu verändern.

25 Das wird mit der technischen Lehre des Anspruches 1 erreicht. Die abhängigen Ansprüche konkretisieren und erweitern den abstrakten - vom Anspruch 1 in seinen tragenden Merkmalen umrissenen - Gedanken der elektrisch steuerbaren
30 Adhäsionswirkung eines - insbesondere dielektrisch abgedeckten - Subminiatur-Elektroden-Areals. Das Areal kann als Streifenfläche oder als Punktfläche ausgebildet sein.

35 Die erfindungsgemäßen Verwendungen der erwähnten Struktur sind von den Ansprüchen 20 bis 22 erfaßt. Anspruch 24 betont die Ausbildung der blanken Elektroden-Areale. Die jeweiligen Spannungsbereiche sind im Anspruch 16 umschrieben.

Mittels einer im Subminiaturbereich (unterhalb von $10\mu\text{m}$) strukturierten planaren Oberfläche können die mikroskopischen und submikroskopischen Partikel oder Zellen (im folgenden: "Teilchen") elektrisch gesteuert an der Isolierschicht
5 angelagert oder abgestoßen werden, ohne sie hohen Belastungen auszusetzen, ohne sie chemisch zu verändern und ohne mit dauerhaften nicht ablösbaren Ablagerungen konfrontiert zu werden. Die Elektrodenareale erhalten eine neue Eigenschaft kraft ihrer Dimensionierung. Die Elektroden können dielektrisch
10 bedeckt oder blank sein (Ansprüche 1, 24). Sind sie blank, werden den streifenförmigen oder punktförmigen Elektroden deutlich geringere Spannungen zugeführt, um die Verluste klein zu halten (Anspruch 16). Höhere Spannungen (im Voltbereich) erlauben die dielektrisch bedeckten Elektroden. Im
15 Subminiaturbereich können so lokal kräftige Felder erzeugt werden, ohne daß die Zellen vollumfänglich mit Kräften beaufschlagt werden. Die Elektrodendimensionierung erlaubt das unsymmetrische (einseitige) Beaufschlagen der Zellen, da Ihre Größe oberhalb des Subminiaturbereichs liegt.

20 Mit den Elektrodensystemen der Erfindung kann mit physiologischen (leitfähigen) und sogar mit hochleitfähigen Lösungen gearbeitet werden. Dieser Umstand erweitert die medizinisch-biologische Anwendung elektrischer Feldtechniken um
25 einen Anwendungsbereich, der bisher für nicht funktionsfähig erachtet wurde.

Der Erfindung liegt dabei die Erkenntnis zugrunde, extrem schmale Elektrodenbänder oder -knöpfe in sich wiederholender
30 Folge auf eine Oberfläche (Substrat) aufzubringen, die so schmal sind, daß im günstigsten Falle mehrere Elektrodenbahnen oder ein Umfeld von eng beieinander liegenden Punkten dem typischen Durchmesser der Teilchen entsprechen.

Unter Subminiaturbereich versteht die Erfindung einen Bereich, der bei etwa $10\mu\text{m}$ beginnt und nach unten unbegrenzt ist, allerdings derzeit durch zur Verfügung stehende Fertigungstechniken auf Bereiche um 100nm bis 500nm beschränkt bleibt. Gleichwohl haben Experimente gezeigt, daß die patentgemäßen Wirkungen umso deutlicher zu Tage treten wenn die Abmessungen weiter verringert werden. Besonders relevant ist demnach der Bereich unter $1\mu\text{m}$.

- 10 Ein direkter Kontakt der Partikel mit den Elektroden wird durch eine aufgelagerte, insbesondere biokompatible (Anspruch 17), dielektrische Schicht verhindert, deren Materialeigenschaften so gewählt werden, daß ein elektrisches Feld mit einer noch ausreichenden Feldstärke in den oberflächennahen
- 15 Flüssigkeitsraum ausgekoppelt werden kann. Da die Feldstärke mit dem reziproken Abstand der Elektroden und proportional zur angelegten Spannungsdifferenz zunimmt, ergibt sich erst im gewählten Submikrometerbereich (Anspruch 17) die Möglichkeit mit geringen Amplituden (100mV bis 1V) die erforderlichen
- 20 Feldstärkegradienten auf einer Seite der Partikeln und Zellen zu erzeugen.

Die in die Flüssigkeit eingekoppelten Feldstärkegradienten werden mit schmaler werdenden Elektroden auch schneller mit dem Abstand von der Oberfläche abfallen, da sich die Anteile im oberflächenfernen Flüssigkeitsbereich überlagern und kompensieren. Dieser Umstand vermindert die elektrische und thermische Belastung der Partikeln außerordentlich.

- 30 Erfindungsgemäß läßt sich dieser Effekt über die Applizierung wandernder elektrischer Oberflächenwellen, vornehmlich im Hochfrequenzbereich (kHz - MHz) verstärken, so daß unter den oben geschilderten Randbedingungen eine elektrische Steuerung der Adhäsionseigenschaften der Oberfläche erfolgen kann und die
- 35 Teilchen erst dann in den elektrischen Einflußbereich der Oberfläche gelangen, wenn sie der Oberfläche sehr nahe kommen.

Die aufgetragenen erfindungsgemäßen Schichten koppeln einerseits das wandernde elektrische Feld in geeigneter Weise in den oberflächennahen Flüssigkeitsraum aus und verhindern andererseits elektrolytische Prozesse, so daß sie in
5 physiologischen Lösungen hoher Leitfähigkeit eingesetzt werden können (Anspruch 20).

Die Isolier-Schichten (Merkmalsgruppe b des Anspruches 1) sind solche Schichten, die die wässrige oder leitfähige Lösung mit
10 den darin suspendierten Teilchen von den Elektroden trennt, demnach "isoliert". Diese Isolierung ist sowohl mechanisch gemeint, sie ist ebenso elektrisch gemeint, es kann auch eine Kombination der beiden vorerwähnten Isoliermöglichkeiten sein. Günstig ist ein hoher Dielektrizitäts-Koeffizient, zwingend
15 erforderlich ist er allerdings nicht.

Bevorzugte Ausführungsbeispiele der Erfindung werden nachfolgend anhand der Figuren näher erläutert.

Figur 1 und Figur 3 sind jeweils perspektivische Ansichten der mikrostrukturierten Oberfläche mit elektrisch leitenden Elektrodenstreifen 22, 42, 44 und aufgelagerten Isolierschichten 23, 45, 43.

Figur 2 und Figur 4 sind Schnittbilder der in Figur 1 und Figur 3 dargestellten Strukturen.

Figuren 1a und 1b sind jeweils Ansichten einer mikrostrukturierten Oberfläche mit elektrisch leitenden Elektrodenstreifen 11 (11a bis 11k) bzw. 17b, 18b, 19b, ohne aufgelagerte Isolierschichten.

Figuren 2a und 2b sind die zugehörigen perspektivischen Schnittbilder der in Figur 1a und 1b dargestellten Strukturen, einmal mit aufliegenden Streifenelektroden 11a, 11b, ... und einmal mit punktförmigen Elektroden 17b, 17b', 17b'' und im Substrat eingebetteten Zuleitungen 17a, 18a, 19a.

Figur 5 dient der Erläuterung der unsymmetrischen Kraftwirkung auf ein zelluläres Objekt 54, dessen Dimension größer ist als die Struktur der Elektroden.

Figur 6 veranschaulicht in zwei Bildern die zellschonende Wirkung von Oberflächenstrukturen im $1\mu\text{m}$ -Bereich.

Figur 7a und Figur 7b sind Darstellungen, wie mit potentialmäßig gesteuerten Elektroden Säure und Base (auch Anode und Kathode) erzeugbar sind um dem pH-Gradienten von Figur 7b im μm -Bereich zu stabilisieren.

Figur 1 und Figur 2 zeigen eine in ihrem Adhäsionsverhalten (bezüglich Teilchen in Suspension) elektrisch steuerbare planare Oberfläche mit einer Elektrodenstreifenfläche 11. Die Elektroden 22 sind über 4 Zuleitungen 12, 13, 14 und 15 zu Gruppen von jeweils 4 Elektroden zusammengefaßt und periodisch in dieser Gruppenkonfiguration (a, b, c, d ...) ansteuerbar. In gleicher Weise können Gruppen aus jeweils 3 oder auch mehr Elektroden gebildet werden. Auf diese Weise ist es möglich, in ihrer Richtung festlegbare elektrische Wanderwellen zu erzeugen.

Im angegebenen Beispiel wird dies erreicht, indem vier um jeweils ein Viertel in der Phase verschobene periodische Signale an die Zuleitungen 12, 13, 14 und 15 angelegt werden, so daß sich über der Elektroden-Streifenfläche 11 ein mit einer vorgebbaren Geschwindigkeit ausbildendes Wanderfeld erzeugt wird, das die Teilchen in der Suspension schonend bewegt.

Die den Elektroden aufgelagerte Isolier-Schicht 23 koppelt die wandernden Felder dielektrisch in die darüber befindliche Flüssigkeit 24 aus und kann biokompatibel sein.

Die Oberflächenwellen werden umso kräftiger ausgekoppelt, je höher die relative Dielektrizitätskonstante und je dünner die Isolier-Schicht 23 gewählt werden. Typische Dicken für die beschriebenen Anwendungen sind einige 10nm bis zu einigen Mikrometern ("Sub-Mikrometerbereich"). Die aufgelagerte Schicht kann jedoch auch durch mono-, bi- und multimolekulare Schichten ersetzt oder ergänzt werden. Mit diesen Schichten können die zellspezifischen biokompatiblen Eigenschaften wesentlich unterstützt werden. Als Materialien kommen beispielsweise Polyuretan, Teflon, Metall- und Halbleiteroxide oder -isolatoren (SiO_2 , SiC , Si_3N_4) in Frage. Die molekularen Schichten können Lipide, Detergentien, Polymere oder ähnliches sein.

Über diese Isolier-Schichten 23 können die Oberflächen zusätzlich lateral in ihren Adhäsionseigenschaften strukturiert und prädeterminiert werden.

Die Steuerung der Adhäsionseigenschaften erfolgt über das Anlegen der hochfrequenten Signale mit Frequenz, gegenseitigem Phasenbezug und Amplitude. Im Beispiel wandern die elektrischen Oberflächenwellen jeweils in eine Richtung. Durch veränderte
5 Beschaltung der Elektroden über die Zuführungen 12,13,14 und 15 können gegenläufige, stehende und alternierende Wellen erzielt werden. Die so gesteuerte Einheit kann auf feste oder flexible Substrate 21 (mit der Oberfläche 16) makroskopisch flächenbedeckend aufgebracht werden.

10 Diese Strukturen können auch in aufgerollter Form die Wände von Schläuchen oder Reaktionsräumen (treatment cells) bilden.

Die beschriebenen Strukturen werden mit bekannten
15 Herstellungstechniken der Halbleitertechnologie, z.B. in Elektronenstrahl-Lithographie und bekannten Abscheide- und Ätzverfahren erzeugt.

Figur 3 und Figur 4 zeigen eine Oberflächenstruktur bei der zwei
20 zueinander dielektrisch isolierte Elektroden-Streifenflächen 42,44 um 90° gedreht angeordnet sind. Die gesamten Elektrodenstreifen sind mit Isolier-Deckschichten 31,32,45 passiviert, über die die wandernden Oberflächenwellen beider Elektrodenebenen in die Flüssigkeit
25 ausgekoppelt werden können. Je nach Anwendungszweck können die Einzelelektroden entweder in Gruppen zusammengefaßt und miteinander verknüpft bzw. einzeln angeschlossen sein. Der Anschluß erfolgt über Zuführungen 33,34, die zu den Elektrodenstreifen oder -gruppen führen.

30 Der Verlauf der Streifen-Elektroden (Figuren 1, 1a, 1b) muß nicht gerade sein, sondern kann in gebogenen, gezackten, mäanderförmigen oder spiraligen Formen auf der Oberfläche 41 verlaufen. Damit lassen sich zusätzlich zu den Adhäsions-
35 Eigenschaften über dem Elektrodenareal befindliche Teilchen sammeln und an bestimmten Orten des Oberflächenarrays ablegen bzw. von diesem entfernen. Muster können gesteuert erzeugt werden.

Figur 1a und 2a zeigen eine im Adhäsionsverhalten (bezüglich Teilchen in Suspension) elektrisch steuerbare Oberfläche mit einer Elektrodenstreifenfläche 11a, 11b, 11c, (kurz: 11), der keine dielektrische Schicht überlagert ist. Es handelt sich also
5 um blanke Elektroden. Die an sie anlegbare Spannung liegt im unteren Voltbereich - je kleiner die Streifenbreite und der Streifenabstand, desto kleiner auch die Spannung.

Figur 1b und Figur 2b zeigen eine im Adhäsionsverhalten
10 (bezüglich Teilchen in Suspension) elektrisch steuerbare Oberfläche mit Elektroden-Punkten 17b, 17b', 17b", 18b, 18b', 18b" und 19b, 19b' und 19b". Die "Elektroden-Buttons" sind von keiner dielektrischen Schicht bedeckt. Ihr gegenseitiger Abstand liegt im Bereich von 100nm bis 1µm. Die an sie angelegten
15 Spannungen liegen im Bereich der vorgenannten zu Figur 1a. Die Zuleitungen zu den Elektroden-Punkten sind im Substrat 21 verlegt. Damit sind die Zuleitungen 17a, 17a', 17a", 18a... und 19a,... isoliert von der Suspension; elektrische Verluste können vermieden werden.

20 Figur 5 zeigt die schematischen Größenverhältnisse, wie sie bei der Verwendung tierischer Zellsuspensionen 56 mit Zellgrößen 54 von einigen Mikrometern auftreten und stellt den günstigsten Fall für physiologisch stark leitfähige Zellsuspensionen dar. Es
25 ist ersichtlich, daß die submikrometerbreiten Elektroden 52 den Einfluß der beschriebenen Oberflächenstrukturen auf den oberflächennahen Raum 55 beschränken. Dadurch ist die belastungsarme Beeinflussung des Zell- und Partikel-Adhäsionsverhaltens gegeben.

30 Es ist davon auszugehen, daß der Oberflächen-Wanderwelleneinfluß in Lösung nur 2 bis 5 Elektrodenbreiten reicht. Damit ist ein nach der Partikelgröße unterschiedlicher Strukturierungsgrad definiert.

35 Jedes der gezeigten Ausführungsbeispiele kann geometrisch variiert und in Hybridstrukturen eingeordnet werden. Ebenfalls kann die erfindungsgemäße Oberflächenstruktur auch zur

Freihaltung von Mikroelementen genutzt werden, die als Sensor eingesetzt werden.

Die Figur 6 veranschaulicht die Wirkung, die mit den zuvor
5 erläuterten Subminiatur-Strukturen gegenüber einer Zelle in der
Größenordnung von einigen $10\mu\text{m}$ erhalten wird. Während große
Elektroden, die einen Abstand von Mitte zu Mitte in der
Größenordnung von $30\mu\text{m}$ haben, die Zelle stark großflächig mit
positiven und negativen Influenzladungen belasten, so daß in der
10 Zelle ein erhebliches Potentialgefälle entsteht, wird dies mit
den im rechten Halbbild gezeigten Subminiatur-Elektroden nicht
mehr geschehen, da sich hier die unterschiedlichen Ladungen an
der Oberfläche der Zelle mit einer Periode wiederholen, die der
Periode der Subminiatur-Elektrodenstreifen etwa entspricht, so
15 daß nur geringes Potentialgefälle entsteht und sich ein
gleichförmig alternierendes Spannungsgefälle an der Oberfläche
der Zelle aufbaut. Dieses ist für die Zelle besonders schonend
und belastet sie nur wenig, während die von den schmalen
Elektrodenstreifen auf die Zelle aufgebrachte Kraft gleichwohl
20 erheblich ist.

Mit dieser Wirkung und den Strukturen gemäß den Figuren 1, 3
und 5 werden also schonende Feldkraft-Abschirmungen, sogenannte
"Field Force Shields" in begrenztem Bereich oberhalb der
25 Subminiatur-Elektrodenstruktur erreicht.

Ein Beispiel für Dimensionierung und Werkstoffe, mit dem
beispielsweise die Figur 5 implementiert wurde, ist
folgendermaßen:

30 Gold-Elektrodenstreifen 52 haben eine Breite von 500nm . Die
Lücke zwischen den Elektrodenstreifen 52a, 52b, 52c, 52d ...
beträgt jeweils 500nm . Die Elektrodenhöhe ist - abweichend
von der rechteckigen Struktur der Figur 5 - etwa auch 500nm .
35 Die Elektrodenstreifen-Struktur wurde mit Elektronenstrahl-
Lithographie erzeugt. Das Substrat 51 ist Silizium. Die
Abdeckschicht 53 ist aus Glas. Ebenfalls aus Glas ist der
Zwischenraum zwischen jeweils zwei Elektroden-Streifen. Das

eingesetzte Feld (die eingesetzte Spannung) hat eine Frequenz von 1MHz und eine Spannung von $1.5V_{pp}$. Die verwendete Erythrozyten-Suspension hat eine Leitfähigkeit von 1.2S/m. Auch nach mehr als einer Stunde blieb die Oberflächenstruktur des beschriebenen Beispiels ohne jede Ablagerung von Erythrozyten.

Das Beispiel und die Darstellung der verschiedenen Subminiatur-Strukturen zeigt die Möglichkeit auf, daß biokompatible Oberflächen geschaffen werden können, bei denen verhindert werden kann, daß sich die Teilchen ablagern, so daß Trombosen vermieden werden können. Daneben bietet sich die Anwendungsmöglichkeit der Sensorik, bei der verhindert werden kann, daß sich Partikel auf den Sensorflächen ablagern, womit Sensoren entstehen, die eine hohe Lebensdauer haben.

Weitere Anwendungen der beschriebenen Strukturen sind die Implanatationstechnik und der Aufbau von Optiken.

Nicht unerwähnt bleiben soll die anhand der Figuren 7a und 7b erläuterte Anwendungsmöglichkeit des im μm -Bereich stabilisierten pH-Gradienten. Mit ihm bietet sich die Möglichkeit der Sichtbarmachung von Elektrodendefekten, mit ihm können chemische Mikro-Reaktionssysteme aufgebaut werden, mit ihm können pharmakologische Testsysteme entstehen, schließlich können biologische/medizinische Zellkulturen erforscht werden.

Die Elektrodenstruktur gemäß der Figur 7a erlaubt die potentialmäßige Steuerung und die Erzeugung von Säure und Base auch Kathode und Anode. Dies gelingt allein mit der elektrischen Ansteuerung der im μm -Bereich geschaffenen Elektroden-Struktur. Die Einzelelektroden werden asymmetrisch mit geringen Spannungen im Bereich zwischen 1V bis 2V gepulst. Abhängig von dem Elektrodenabstand (Figur 7b) entstehen unterschiedliche pH-Werte, mit denen ein Gradient oberhalb der Elektroden-Struktur geschaffen werden kann. Der pH-Gradient kann über einen pH-abhängigen Fluoreszenzmarker sichtbar gemacht werden.

Ansprüche:

1. Adhäsionssteuerbare Oberflächenstruktur auf einem Substrat (21,41,51) zur Verwendung mit einer wässrigen oder leitfähigen Lösung und darin suspendierten mikroskopischen und submikroskopischen Partikeln oder Zellen (Teilchen),
dadurch gekennzeichnet,
 - (a) daß in Gruppen ansteuerbare Elektroden (11;52;22;42,44;17b,18b,19b) mit Breite und Abstand im Subminiaturbereich mit zueinander phasenverschobenen oder gepulsten hochfrequenten periodischen Signalen beaufschlagt (12 bis 15;34,33; 17a,18a,19a) werden;
 - (b) die daraus resultierenden wandernden und/oder stehenden elektrischen Oberflächenwellen - insbesondere über die Elektroden bedeckenden Isolier-Schichten (23;53;43,45) - in die oberflächennahe wässrige oder leitfähige Lösung ausgekoppelt werden.
2. Adhäsionssteuerbare Oberflächenstruktur nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die über jeweils mindestens drei Elektroden (22a,22b,22c,22d) erzeugten wandernden elektrischen Oberflächenwellen in ihrer Wanderrichtung periodisch umgeschaltet werden und/oder aufeinander zu bzw. voneinander weg laufen.
3. Adhäsionssteuerbare Oberflächenstruktur nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die über jeweils mindestens drei Elektroden (22a,22b,22c) erzeugten wandernden elektrischen Oberflächenwellen unterschiedliche Wandergeschwindigkeiten dadurch besitzen, daß die Elektroden (22;42,44;52) der Gruppen mit in der Frequenz verschiedenen periodischen Signalen angesteuert werden.
4. Adhäsionssteuerbare Oberflächenstruktur nach einem der erwähnten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Wandergeschwindigkeit der elektrischen Oberflächenwellen sich periodisch ändert und/oder stehende Wellen erzeugt werden.

5. Adhäsionssteuerbare Oberflächenstruktur nach einem der erwähnten Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß die den Elektroden aufgelagerten Isolier-Schichten (23;43,45;53) verlustbehaftete Dielektrika sind, die die Elektroden
5 zumindest teilweise bedecken.
6. Adhäsionssteuerbare Oberflächenstruktur nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß die den Elektroden aufgelagerten Isolier-Schichten (23;53;43,45) aus mehreren Lagen bestehen
10 und/oder mikrostrukturiert sind.
7. Adhäsionssteuerbare Oberflächenstruktur nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß zwischen den Elektrodenstreifen ein anderes
15 dielektrisches Material streifen- oder domänenartig angeordnet ist.
8. Adhäsionssteuerbare Oberflächenstruktur nach einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Elektroden (11;22) streifenförmig oder punktförmig
20 (17b,17b',17b"; 18b,18b',18b"; 19b) ausgebildet sind und im Vergleich zur Elektrodendimension (Breite oder Durchmesser) makroskopische Flächen bedecken ("Elektrodenareale").
- 25 9. Adhäsionssteuerbare Oberflächenstruktur nach einem der Ansprüche 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß - zueinander isoliert (43) - mehrere Elektrodenareale (42,44) übereinander angeordnet sind.
- 30 10. Adhäsionssteuerbare Oberflächenstruktur nach einem der Ansprüche 1 bis 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Elektrodenstreifen senkrecht zur Oberfläche gewellt oder gefaltet sind.
- 35 11. Adhäsionssteuerbare Oberflächenstruktur nach einem der Ansprüche 1 bis 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Oberflächenstrukturen mit halbleitertechnologischen Methoden auf Substraten (21,41,51), wie Silizium, Glas, Plastik, Keramik oder flexiblem Folien-Material,
40 strukturiert ist.

12. Adhäsionssteuerbare Oberflächenstruktur nach einem der Ansprüche 1 bis 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß durch Aussteuerung einzelner Elektroden (22a, 22b, 22c, 22d; 42a, 42b ...; 44a, 44b ...; 52a, 52b ...) oder Elektrodengruppen in lokal begrenzten Bereichen Adhäsionsmuster mit einem Auflösungsraaster der doppelten Elektrodenbreite erzeugt werden.
13. Adhäsionssteuerbare Oberflächenstruktur nach einem der Ansprüche 1 bis 12, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie mindestens teilweise Rohre, Test- oder Reaktionsräume, Schläuche, Kanäle, Sensoroberflächen, Implantatoberflächen und Lagergefäße auskleiden.
14. Adhäsionssteuerbare Oberflächenstruktur nach einer der Ansprüche 1 bis 13, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie durch Kanäle oder Poren oder sonstige Verbindungen, die die angrenzenden Volumenphasen hydrodynamisch, osmotisch oder elektrisch zueinander in Kontakt bringen, in regelmäßiger oder unregelmäßiger Anordnung durchbrochen ist.
15. Adhäsionssteuerbare Oberflächenstruktur nach einer der Ansprüche 1 bis 14, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Elektroden durch elektronische Bauelemente, wie Transistoren oder Dioden, partiell oder vollständig ersetzt oder angesteuert sind.
16. Adhäsionssteuerbare Oberflächenstruktur nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **gekennzeichnet durch**, Signale im Voltbereich (0.1V über 0.5V bis 1.5V) für dielektrisch bedeckte Elektrodenareale (42, 43, 44); Signale im unteren Voltbereich (0.01V über 0.05V bis 0.25V) für unbedeckte (blanke) Elektrodenareale (17b, 17b', 18b).
17. Oberflächenstruktur nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Isolierschicht (23; 43, 45; 53) (a) eine Dicke (d) im Sub-Mikrometerbereich (von molekularer Dicke bis μm -Dicke) aufweist; und/oder (b) biokompatibel ist.

18. Oberflächenstruktur nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die dielektrische Schicht (23;43,45) aus einem in der
Halbleitertechnik verwendeten Werkstoff gebildet wird,
5 insbesondere aus SiO_2 , SiC , Si_3N_4 , Bariumtitanat, Tantaloxyd
oder einem Abdecklack.
19. Oberflächenstruktur nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
10 daß der Subminiaturbereich sich von etwa $10\mu\text{m}$ abwärts
erstreckt, insbesondere deutlich unterhalb von $10\mu\text{m}$ liegt.
20. Verwendung einer Oberflächenstruktur nach einem der
vorhergehenden Ansprüche für/in eine(r) physiologische(n)
15 Lösung hoher Leitfähigkeit, insbesondere Nährlösung.
21. Verwendung einer Oberflächenstruktur nach einem der
Ansprüche 1 bis 19 als Biosensor hoher Lebensdauer.
- 20 22. Verwendung einer Oberflächenstruktur nach einem der
Ansprüche 1 bis 19 als Biosensor zur Stabilisierung von
pH-Gradienten in wässrigen oder leitfähigen Lösungen.
23. Oberflächenstruktur nach einem der Ansprüche 1 bis 19,
25 dadurch gekennzeichnet, daß die Isolier-Schicht (23;43,45)
(a) eine mechanische Trennschicht, eine elektrische
Isolierschicht oder eine Kombination davon ist; und/oder
(b) eine dielektrische Schicht mit insbesondere hohem
Dielektrizitäts-Koeffizienten ist.
- 30 24. Oberflächenstruktur nach einem der Ansprüche 1 bis 19 oder
23, dadurch gekennzeichnet, bei der die Zuleitungen
(17a,17a',18a,19a) zu den - zur Suspension hin blanken -
Elektroden (17b, 17b',18b,19b) im Substrat (21) eingebettet
35 sind.

Fig.1

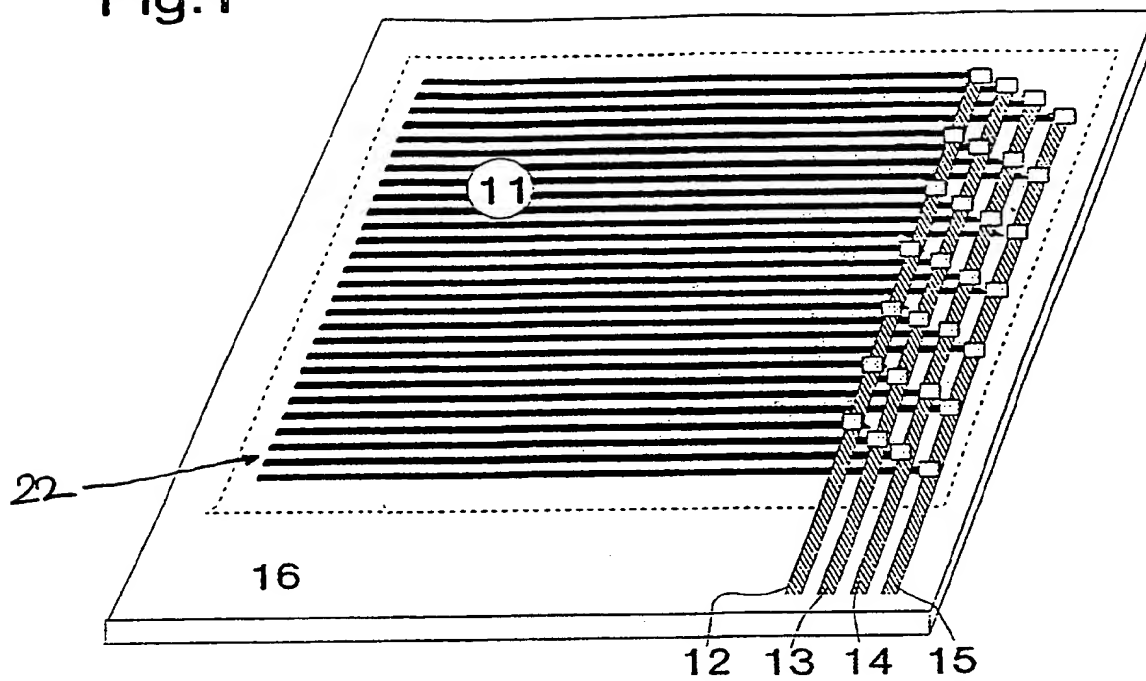
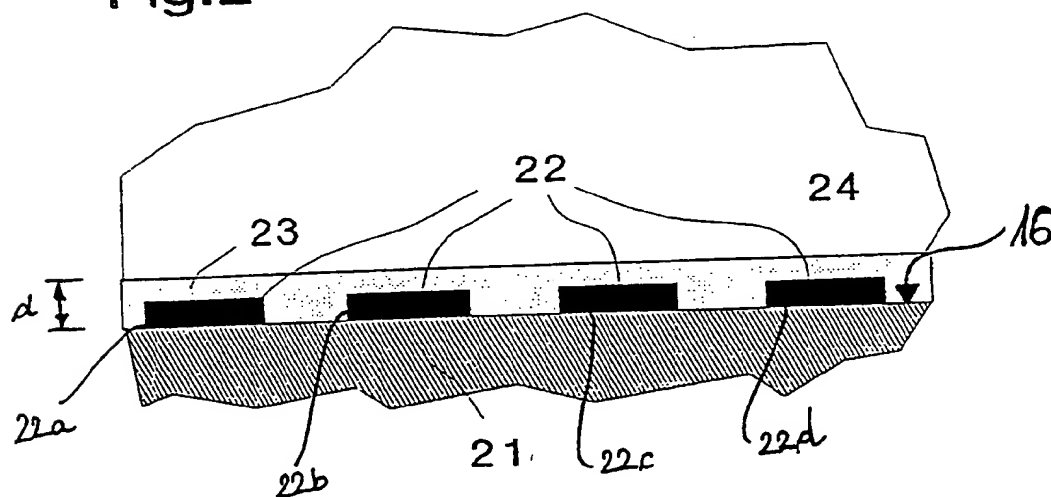


Fig.2



ERSATZBLATT

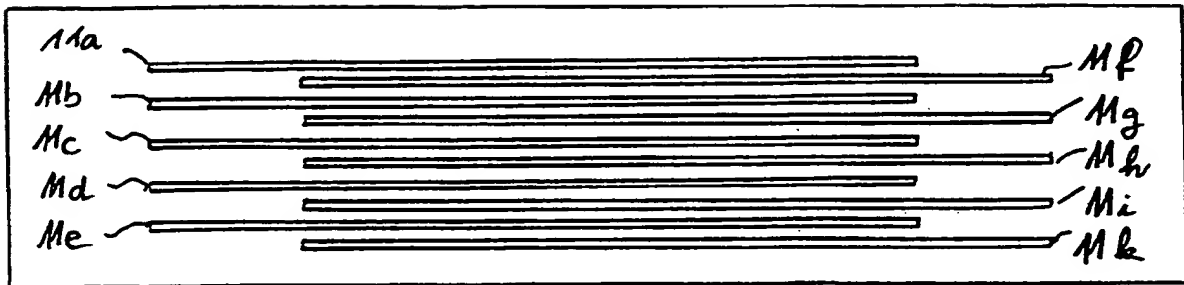


Fig. 1a

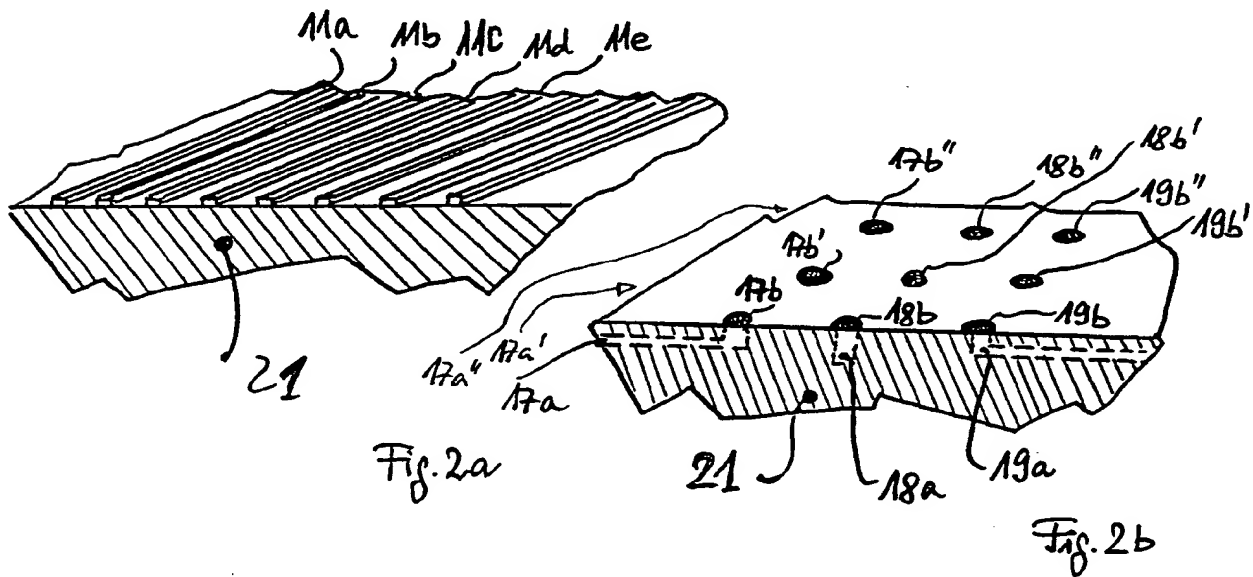
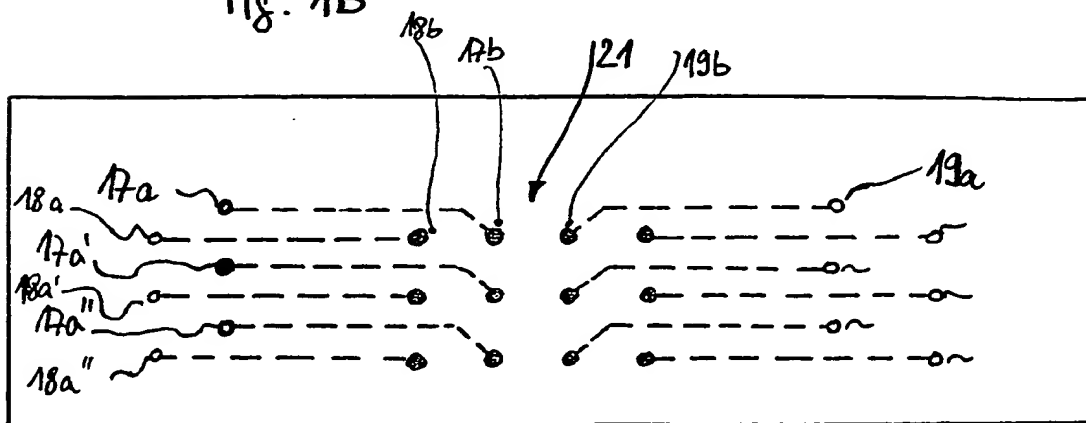


Fig. 2a

Fig. 2b

Fig. 1b



3 / 5

Fig.3

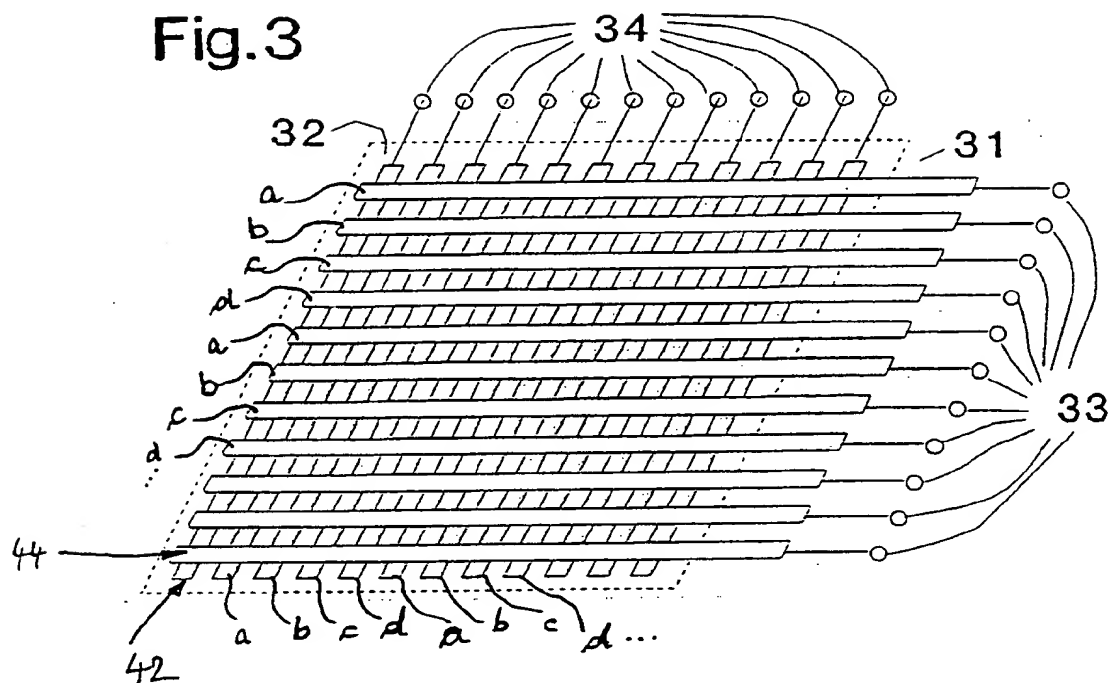
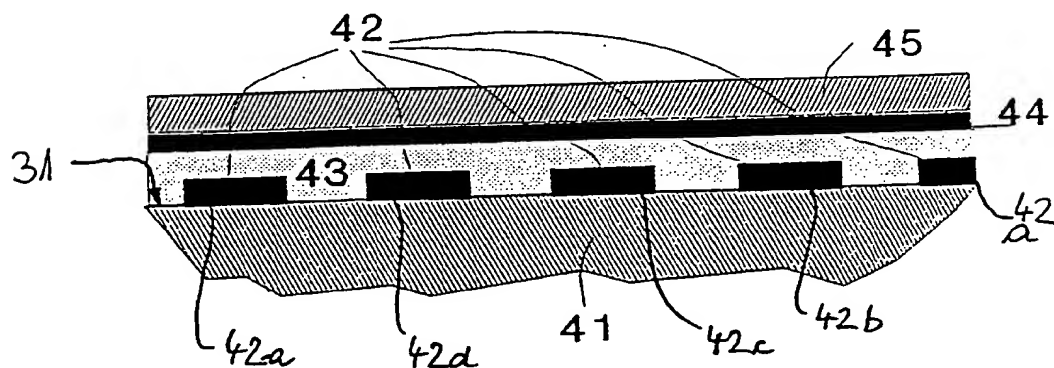


Fig.4



ERSATZBLATT

Fig.5

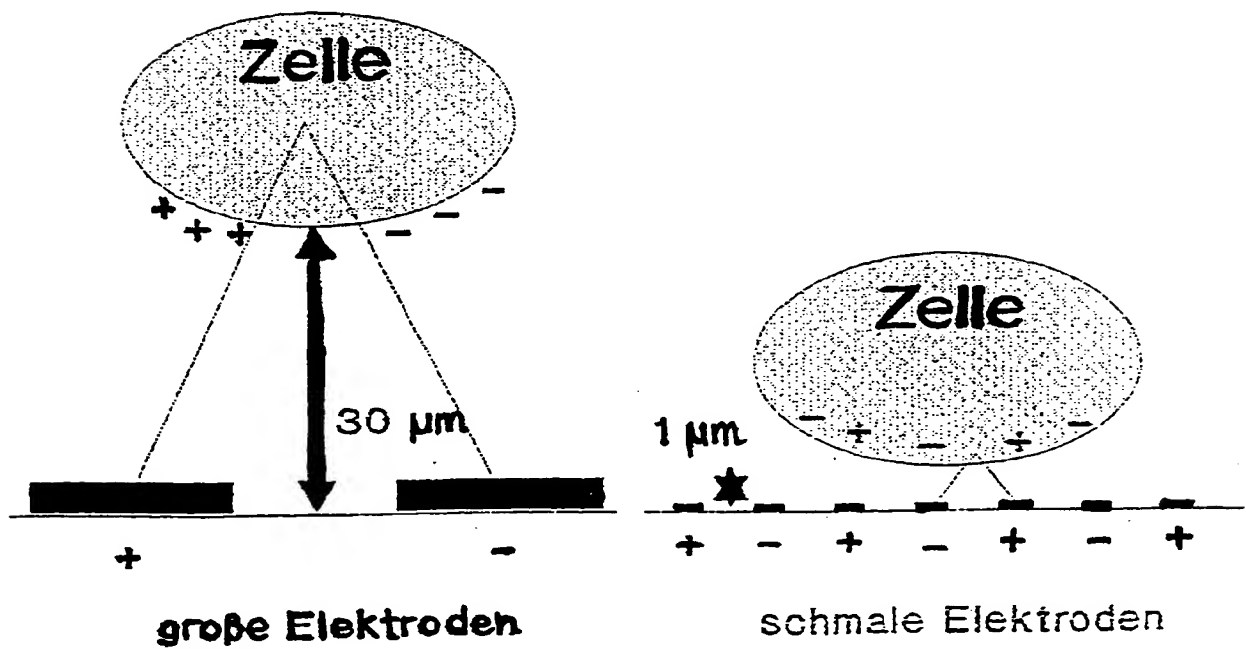
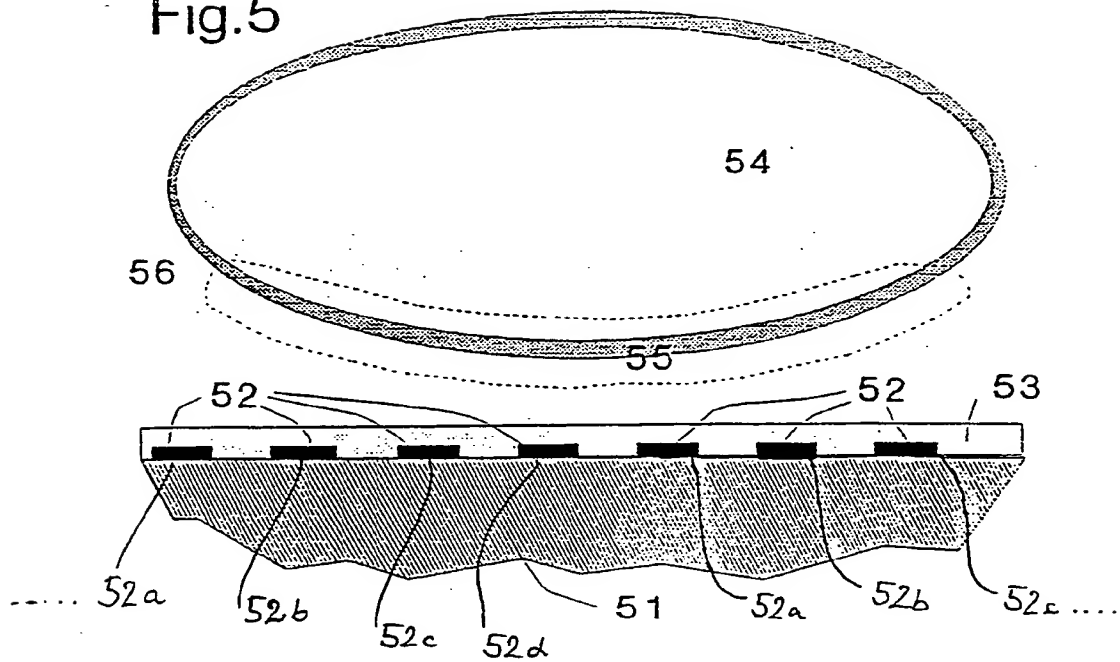


Fig.6

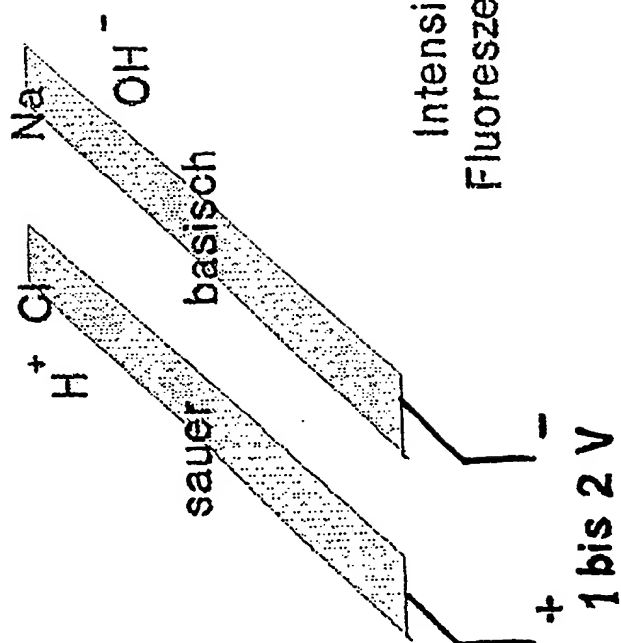
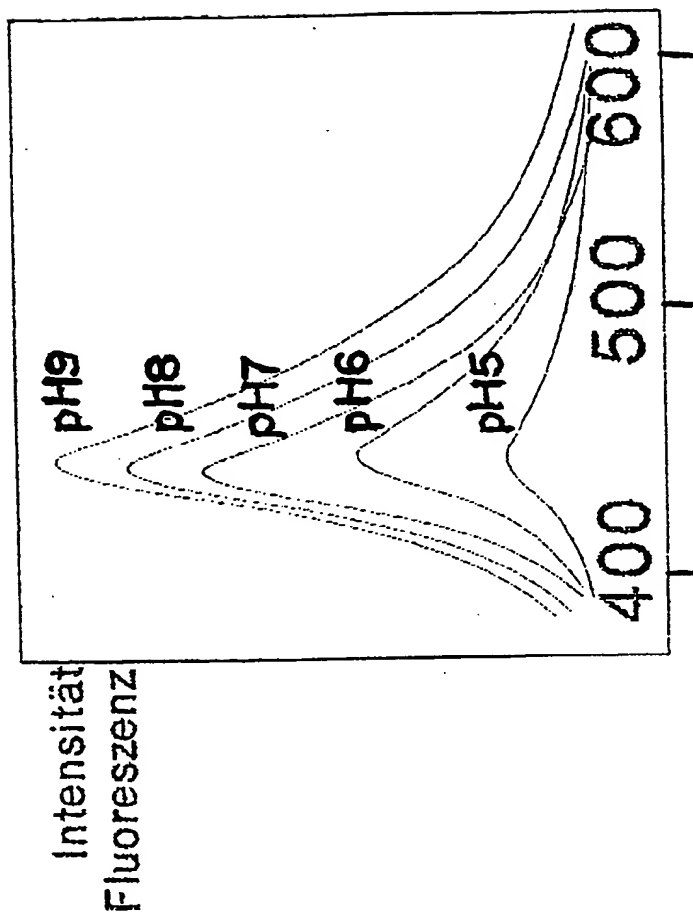


Fig. 7a

Fig. 7b



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 94/01530

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 B03C5/00 B03C5/02 G01N33/483 G01N33/487

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 B03C G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE,A,41 27 405 (FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG EV) 25 February 1993 see the whole document ---	1-18,23, 24
A	ELECTROPHORESIS, vol. 13,no. 1/2, January 1992 - February 1992 DEERFIELD BEACH, FL, US, pages 49-54, XP 000430628 R. HAGEDORN, ET AL. 'TRAVELING-WAVE DIELECTROPHORESIS OF MICROPARTICLES' see the whole document --- -/--	1-4,11, 12,18,19

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 April 1995

Date of mailing of the international search report

15.05.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Bosma, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/DE 94/01530

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JOURNAL OF PHYSICS D APPLIED PHYSICS., vol. 26,no. 9, 14 September 1993 LETCHWORTH GB, pages 1528-1535, XP 000430867 Y. HUANG, ET AL. 'ELECTROKINETIC BEHAVIOUR OF COLLOIDAL PARTICLES IN TRAVELLING ELECTRIC FIELDS: STUDIES USING YEAST CELLS' see the whole document -----	1-4
A	WO,A,91 11262 (P & B (SCIENCES) LIMITED) 8 August 1991 cited in the application see the whole document -----	1-4,8, 11,13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 94/01530

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE-A-4127405	25-02-93	WO-A- 9303850 EP-A- 0599957 JP-T- 6509745	04-03-93 08-06-94 02-11-94
WO-A-9111262	08-08-91	AU-B- 657086 AU-A- 7151191 EP-A- 0513064	02-03-95 21-08-91 19-11-92

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In' tionales Aktenzeichen
PCT/DE 94/01530

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 B03C5/00 B03C5/02 G01N33/483 G01N33/487

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 B03C G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE,A,41 27 405 (FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG EV) 25.Februar 1993 siehe das ganze Dokument ---	1-18,23, 24
A	ELECTROPHORESIS, Bd. 13,Nr. 1/2, Januar 1992 - Februar 1992 DEERFIELD BEACH, FL, US, Seiten 49-54, XP 000430628 R. HAGEDORN, ET AL. 'TRAVELING-WAVE DIELECTROPHORESIS OF MICROPARTICLES' siehe das ganze Dokument --- -/--	1-4,11, 12,18,19

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

25.April 1995

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

15.05.95

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Bosma, R

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In tionales Aktenzeichen

PCT/DE 94/01530

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>JOURNAL OF PHYSICS D APPLIED PHYSICS., Bd. 26,Nr. 9, 14.September 1993 LETCHWORTH GB, Seiten 1528-1535, XP 000430867 Y. HUANG, ET AL. 'ELECTROKINETIC BEHAVIOUR OF COLLOIDAL PARTICLES IN TRAVELLING ELECTRIC FIELDS: STUDIES USING YEAST CELLS' siehe das ganze Dokument -----</p>	1-4
A	<p>WO,A,91 11262 (P & B (SCIENCES) LIMITED) 8.August 1991 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument -----</p>	1-4,8, 11,13

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In nationales Aktenzeichen

PCT/DE 94/01530

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE-A-4127405	25-02-93	WO-A- 9303850 EP-A- 0599957 JP-T- 6509745	04-03-93 08-06-94 02-11-94
WO-A-9111262	08-08-91	AU-B- 657086 AU-A- 7151191 EP-A- 0513064	02-03-95 21-08-91 19-11-92

THIS PAGE BLANK (USPTO)